



دانشکده پیراپزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد

گروه زیست فناوری پزشکی

موضوع

اصلاح و بررسی ساختاری فرمهای طبیعی و دستکاری شده زیرواحدهای S100A8/ S100A9 و نیز کالپروتکتین طبیعی بیان شده

استاد راهنما

آقای دکتر نعمت الله غیبی

استاد مشاور

آقای دکتر کوروش گودرزوند

دانشجو

عباس شهسواری

فهرست اختصارات

Ag	Antigen
Amp	Ampicillin
APC	Antigen presenting cell
APS	Ammonium persulfate
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
AU	Arbitrary units
B-cell	Bursa dependent lymphocyte
Bp	Base pair
CD	Circular dichroism
CFA	Cystic Fibrosis Antigen
CK	Caseine Kinase
CRP	C-Reactive Peptide
CSF	Cystic Fibrosis Factor
Cys	Cystein
Da	Dalton
DC	Dendritic cell
d-DMSO	Al-deuterated dimethyl sulfoxide
DTT	1, 4-dithiothreitol
EDTA	Ethylene diaminetetraacetate
ESR	Erythrocyte Sedimentation Rate
FAD	Flavin adenine dinucleotide
Gdn-HCl	Guanidine hydrochloride
GST	Glutathione-S-transferase
HIV	Human immunodeficiency
HL60	Human Leukocyte
Ig	Immuno globulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-thio- β -D-galactoside
kDa	Kilo Dalton
M	Marker
MIF	Migration inhibitory factor
MPEG	Mono methoxy poly ethylene glychol
MRP	Meyloid Inhibitory Factor Related Protein
MS	Multiple sclerosis
MW	Molecular weight
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NBS	N-Bromo succinimide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
IFγ	Interferon gamma
Ni²⁺-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glychol
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RPM	Revolutions per minute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate Polyacrilamide gel

	electrophoresis
T-cell	Thymus dependent lymphocyte
TEMED	N,N,N',N' – tetramethylethylenediamine
TLR	Toll-like receptor
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
UFAs	Unsaturated fatty Acids
UV	Ultra violet

کد سه حرفی اسیدهای آمینه

Alanine	A	Ala	Leucine	L	Leu
Arginine	R	Arg	Lysine	K	Lys
Asparagine	N	Asn	Methionine	M	Met
Asparatic acid	D	Asp	Phenylalanine	F	Phe
Cysteine	C	Cys	Proline	P	Pro
Glutamine	Q	Gln	Serine	S	Ser
Glutamic acid	E	Glu	Threonine	T	Thr
Glycine	G	Gly	Tryptophan	W	Trp
Histidine	H	His	Tyrosine	Y	Tyr
Isoleucine	I	Ile	Valine	V	Val

فهرست مطالب

خلاصه فارسی..... ۱

فصل اول: مقدمه و اهمیت موضوع

مقدمه..... ۳

اهمیت موضوع و ضرورت انجام تحقیق..... ۹

اهداف طرح..... ۱۲

فرضیات..... ۱۱

جدول متغیرها..... ۱۲

فصل دوم: مروری بر متون

۲-۱. کالپروتکتین..... ۱۴

۲-۲. سلول های مولد کالپروتکتین..... ۱۴

۲-۳. ویژگیهای ژنی و تنظیم بیان ژن کالپروتکتین..... ۱۴

۲-۴. تغییرات شیمیایی پس از ترجمه..... ۱۵

۲-۵. دوتایی شدن زیر واحدها..... ۱۶

۲-۶. برهمکنش کالپروتکتین با عنصر کلسیم..... ۱۷

۲-۷. وظایف بیولوژیکی کالپروتکتین..... ۱۹

۲-۷-۱. مهار رشد ارگانیسم های پروکاریوتی..... ۲۰

۲-۷-۲. مهار رشد قارچ..... ۲۰

۲-۷-۳. مهار شدن سلولهای سرطانی..... ۲۰

۲-۷-۴. مهار رشد سلول های طبیعی یوکاریوتی..... ۲۱

۲-۷-۵. اثر مهار کالپروتکتین روی ماتریکس پروتئینازها..... ۲۱

۲-۷-۶. اثر مهار کالپروتکتین روی آنزیم کازئین کیناز..... ۲۲

۲-۷-۷. تأثیر کالپروتکتین روی سیستم ایمنی..... ۲۲

۲-۷-۸. فعالیت MIF کالپروتکتین..... ۲۲

۲-۷-۹. مداخله کالپروتکتین در فرایند فاگوسیتوز سلولی..... ۲۳

۲-۷-۱۰. کالپروتکتین ، بیماری ها و فرایند های التهابی .. ۲۳

۲-۷-۱۱. نقش کالپروتکتین در تشخیص بیماری های دستگاه گوارش..... ۲۴

۲-۸. پلی اتیلن گلیکول..... ۲۴

۲۷.....	۲-۹. سنتز پلی اتیلن گلیکول.....
۲۷.....	۲-۱۰. متوکسی پلی اتیلن گلیکول
۲۸.....	۲-۱۱. سنتز متوکسی پلی اتیلن گلیکول.....
۲۸.....	۲-۱۲. شیمی پیگلاسیون.....
۲۸.....	۲-۱۳. روشهای ایجاد مشتقات mPEG فعال.....
۲۹.....	۲-۱۴. متوکسی پلی اتیلن گلیکولهای فعال.....
۲۹.....	۲-۱۵. روش فعال سازی mPEG توسط ۲ و ۴ و ۶ تری کلرو S- تری آزین (سیانوریک کلراید).....
۳۰.....	۲-۱۶. آمینواسیدها و مکان های فعال برای واکنش با PEG
۳۳.....	۲-۱۷. پروتئینهای درمانی.....
۳۳.....	۲-۱۸. ارزشیابی درمانی پروتئین ها.....
۳۴.....	۲-۱۹. مزدوج شدن به پلیمرهای طبیعی و یا سنتزی.....
۳۵.....	۲-۲۰. مبنای رهایش کنترل شده دارو در سامانه های نوین دارورسانی.....
۳۷.....	۲-۲۱. نتایج اصلاح با منو متوکسی پلی اتیلن گلیکول و کاربردهای زیست پزشکی و زیست فناوری.....
۴۲.....	۲-۲۲. پروتئین.....
۴۳.....	۲-۲۳. پروتئین های نو ترکیب.....
۴۴.....	۲-۲۴. بررسی تاخوردگی پروتئین ها.....
۴۵.....	۲-۲۵. چاپرونها.....
۴۶.....	۲-۲۶. ابزارهای بررسی ساختارها پروتئین ها.....
۴۶.....	۲-۲۶-۱. طیف سنجی فلورسانس.....
۴۷.....	۲-۲۶-۲. اسپکتروسکوپی CD.....
۴۸.....	۲-۲۷. دناتوراسیون.....
۴۹.....	۲-۲۸. NBS (ان برومو سوکسینمید).....

فصل سوم: مواد و روش ها

۵۲.....	۳-۱. مواد، تجهیزات و متغیر های آزمایش
۵۲.....	۳-۱-۱. مواد مورد استفاده در آزمایش.....
۵۲.....	۳-۱-۲. دستگاه ها و تجهیزات مورد استفاده در آزمایش.....
۵۵.....	۳-۳. محلول ها و بافرها.....
۵۸.....	۳-۴. خلاصه روش کار.....
۵۹.....	۳-۵. روش کار.....

۵۹.....	۳-۵-۱. طراحی وکتور حامل ژنهای کد کننده S100A8 و S100A9.....
۶۰.....	۳-۵-۲. ترانسفورماسیون.....
۶۰.....	۳-۵-۳. بیان ژن و تائید.....
۶۰.....	۳-۵-۴. آماده سازی ژل SDS-PAGE.....
۶۱.....	۳-۵-۵. بررسی میزان حلالیت زیر واحد ها.....
۶۲.....	۳-۵-۶. کشت در حجم بالا.....
۶۲.....	۳-۵-۷. لیز کردن نمونه ها.....
۶۲.....	۳-۵-۸. محلول کردن رسوب زیر واحد S100A9.....
۶۳.....	۳-۵-۹. تخلیص با ستون کروماتوگرافی ستونی Ni ²⁺ -NTA.....
۶۳.....	۳-۵-۱۰. دیالیز پروتئین های نو ترکیب پس از تخلیص.....
۶۳.....	۳-۵-۱۱. تعیین غلظت با استفاده از دستگاه نانودراپ.....
۶۳.....	۳-۶. نحوه پگیله کردن پروتئین ها.....
۶۴.....	۳-۶-۱. فعال سازی متوکسی پلی اتیلن گلیکول با ۲ و ۴ و ۶ تری کلرو و ۱ و ۳ و ۵ تری آزین (سیانوریک کلراید).....
۶۴.....	۳-۶-۲. اتصال mPEG به کمپلکس پروتئینی (پگیلاسیون).....
۶۵.....	۳-۷. NBS (ان برومو سوکسینمید).....
۶۵.....	۳-۸. طیف سنجی فلورسانس.....
۶۶.....	۳-۹. طیف سنجی دورنگ نمایی حلقوی (Far-UV CD).....

فصل چهارم: یافته ها و نتایج

۶۹.....	۴-۱. نتایج حاصل از ترانسفورماسیون.....
۶۹.....	۴-۲. نتایج مربوط به انتقال تک کلونی های ترانسفرم شده به محیط مایع والقا بیان ژن.....
۷۱.....	۴-۳. نتایج بررسی میزان حلالیت پروتئینهای نو ترکیب.....
۷۲.....	۴-۴. نتایج حاصل از تخلیص پروتئین.....
۷۴.....	۴-۵. نتایج مربوط به دیالیز.....
۷۵.....	۴-۶. اندازه گیری غلظت پروتئین.....
۷۶.....	۴-۷. نتایج بررسی میزان نشر فلورسانس زیر واحدها و کمپلکس پروتئینی در تیمار با PEG و NBS.....
۷۹.....	۴-۸. جداول تغییرات بیشینه های طول موج در تکنیک نشر فلورسانس.....
۸۱.....	۴-۹. نتایج حاصل از اسپکتروسکوپی.....

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱. بحث و نتیجه گیری.....	۸۷
۵-۲. بررسی مراحل تولید پروتئین.....	۸۷
۵-۲-۱. جذب پلاسمید نو ترکیب توسط Ecoli.....	۸۸
۵-۲-۱-۲. بررسی موفقیت ترانسفورماسیون در این مطالعه.....	۸۸
۵-۳-۱. القا باکتریها و تولید پروتئین (Induction).....	۸۹
۵-۳-۱-۱. زمان مناسب برای القاء در این مطالعه.....	۹۱
۵-۳-۲. مدت زمان لازم برای انکوباسیون پس از القاء محیط کشت.....	۹۰
۵-۳-۳. بررسی مدت زمان انکوباسیون پس از القا در این مطالعه.....	۹۰
۵-۴. دمای انکوباسیون پس از القا.....	۹۱
۵-۵. پروتئین محلول و نا محلول.....	۹۱
۵-۵-۱. بررسی محلول بودن پروتئین در این مطالعه.....	۹۲
۵-۵-۲. فاکتورهای موثر در تولید پروتئین محلول.....	۹۲
۵-۶. Tag های متصل به پروتئین.....	۹۲
۵-۷. بررسی فرایند تخلیص در این مطالعه.....	۹۳
۵-۸. بررسی فرایند دیالیز در این مطالعه.....	۹۳
۵-۹. دوتایی شدن زیرواحدهای کالپروتکتین.....	۹۳
۵-۱۰. غلظت پروتئین.....	۹۴
۵-۱۰-۱. بررسی غلظت پروتئین در این مطالعه.....	۹۴
۵-۱۰-۲. بازده تولید پروتئین.....	۹۴
۵-۱۱. بررسی طراحی وکتور در این مطالعه.....	۹۶
۵-۱۲. فعالسازی PEG.....	۹۶
۵-۱۳. تفسیر مطالعات فلئورسانس و.....	۹۷
۵-۱۴. اثرات آنزیم تریپسین بر روی کمپلکس پروتئینی کالپروتکتین پگیله و غیر پگیله.....	۹۹
فهرست منابع.....	۱۰۰
چکیده انگلیسی.....	۱۱۸

فهرست شکل ها و نمودارها

- شکل ۱: ساختار هتروداایمری کالپروتکتین دوزیر واحدی..... ۳
- شکل ۲: ساختار هترو تترامر کالپروتکتین با چهار زیر واحد..... ۴
- شکل ۳: ملکول پروتئینی پگیله نشده..... ۸
- شکل ۴: ملکول پروتئینی پگیله شده..... ۸
- شکل ۵: ساختار سوم و چهارم S100A8 و S100A9 با اشکال نواری..... ۱۷
- شکل ۶: اسید آمینه های S100A8 و S100A9 با مارپیچ های آلفا و لوپهای متصل شونده به کلسیم..... ۱۸
- شکل ۷: پلیمریزاسیون پلی اتیلن گلیکول..... ۲۷
- شکل ۸: فعال سازی MPEG با سیانوریک کلراید..... ۳۰
- شکل ۹: ایجاد MPEG 2 از طریق سیانوریک کلراید..... ۳۲
- شکل ۱۰: منحنی غلظت دارو در پلاسما با استفاده از سیستمهای متداول داروسازی..... ۳۶
- شکل ۱۱: منحنی غلظت دارو در پلاسما با استفاده از سیستمهای رهایش کنترل شده دارو..... ۳۷
- شکل ۱۲: ملکول پگیله شده..... ۳۹
- شکل ۱۳: PEG-Intron™..... ۴۱
- شکل ۱۴: داروی PEG ASYS..... ۴۱
- شکل ۱۵: تصویر شماتیک بررسی تاخوردگی پروتئین با بررسی طیف سنجی فلوئورسانس تریپتوفان..... ۴۵
- شکل ۱۶: انواع چاپرونها (Folding, Holding, Disaggregation) و تبدیلات میان آنها..... ۴۶
- شکل ۱۷: کلونی های ترانسفرم شده S100A9 پس از کشت شبانه..... ۶۹
- شکل ۱۸: SDS PAGE از بیان زیر واحدها..... ۷۰
- شکل ۱۹: بررسی بیان ژن نو ترکیب S100A8 در باکتری Ecoli BL21 از طریق SDS PAGE..... ۷۱
- شکل ۲۰: بررسی حالیت زیر واحدها S100A9 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد..... ۷۲

- شکل ۲۱: بررسی حلالیت زیر واحدها S100A8 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد..... ۷۲
- شکل ۲۲: خالص سازی زیر واحد نو ترکیب S100A9 با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni²⁺-NTA..... ۷۳
- شکل ۲۳: SDS-PAGE از S100A8 در غلظت های مختلف ایمیدازولی..... ۷۴
- شکل ۲۴: SDS-PAGE از S100A9 در غلظت های مختلف ایمیدازولی..... ۷۴
- شکل ۲۵: SDS-PAGE از محلول پروتئینی دیالیز شده S100A8..... ۷۵
- شکل ۲۶: SDS-PAGE از محلول پروتئینی دیالیز شده S100A8/A9..... ۷۵
- شکل ۲۷: طیف نشر فلورسانس از کمپلکس S100A8/A9 در حضور mPEG در غلظتهای مختلف..... ۷۶
- شکل ۲۸: طیف نشر فلورسانس از کمپلکس S100A8/A9 پیگیله در حضور سه PH مختلف..... ۷۷
- شکل ۲۹: طیف نشر فلورسانس از کمپلکس S100A8/A9 پیگیله نشده در حضور ۳ نسبت غلظتی از آنزیم تریپسین..... ۷۸
- شکل ۳۰: طیف نشر فلورسانس از کمپلکس S100A8/A9 پیگیله شده در حضور ۳ نسبت غلظتی از آنزیم تریپسین..... ۷۸
- شکل ۳۱: طیف نشر فلورسانس از کمپلکس S100A8/A9 پیگیله نشده در حضور ۳ غلظت از NBS..... ۷۹
- شکل ۳۲: طیف نشر فلورسانس از کمپلکس S100A8/A9 پیگیله شده در حضور سه غلظت از NBS..... ۷۹
- شکل ۳۳: طیف سنجی CD روی کمپلکس S100A8/A9 و اثر دهی کلسیم روی آن..... ۸۲
- شکل ۳۴: طیف سنجی CD روی کمپلکس S100A8/A9 بابررسی اثر دو PH بالا و پایین بر میزان پیگیلاسیون..... ۸۲
- شکل ۳۵: طیف سنجی CD روی کمپلکس پیگیله شده S100A8/A9 بابررسی اثر تریپسین ۰/۰۱٪ در زمانهای مختلف..... ۸۳
- شکل ۳۶: طیف سنجی CD روی کمپلکس پیگیله نشده S100A8/A9 بابررسی اثر تریپسین ۰/۰۱٪ در زمانهای مختلف..... ۸۳
- شکل ۳۷: طیف سنجی CD روی کمپلکس S100A8/A9 بابررسی اثر NBS..... ۸۴

فهرست جداول

- جدول ۱- خصوصیات PEG..... ۲۶
- جدول ۲- شرایط واکنش برای تهیه PEG-Protein..... ۳۲
- جدول ۳- فهرستی از پروتئین های نو ترکیبی انسانی که توسط FDA به ثبت رسیده است..... ۳۵

- جدول ۴-مثالهایی از ترکیبات اصلاح یافته با پلی اتیلن گلیکول.....۳۵
- جدول ۵-نیمه عمر پروتئین های گونا گون که با PEG اصلاح شده.....۳۸
- جدول ۶-استفاده از PEG با وزن ملکولی بالا در تولید داروها.....۳۹
- جدول ۷-خواص فارماکوسیتیک اینترفرونهای پگیله شده.....۴۰
- جدول ۸-کمپلکس های PEG-Protein برای استفاده های درمانی.....۴۲
- جدول ۱۰-مقادیر جذب زیر واحدها در ساعات مختلف قبل از القا.....۷۰
- جدول ۱۱- بیشینه طول موج های ترکیبات کمپلکس پروتئینی و غلظت های مختلف PEG.....۸۰
- جدول ۱۲- بیشینه طول موج های ترکیبات کمپلکس پروتئینی با PEG در سه PH مختلف.....۸۰
- جدول ۱۳- بیشینه طول موج های ترکیب تریپسین ۱/۰/۰/۱ با ترکیب کمپلکس پروتئینی۸۰
- جدول ۱۴- بیشینه طول موج های ترکیب تریپسین ۱/۰/۰/۱ با ترکیب کمپلکس پروتئینی پگیله شده.....۸۰
- جدول ۱۵- بیشینه طول موج های ترکیب ان برومو سوکسینمید در غلظت های مختلف با ترکیب کمپلکس پروتئینی.....۸۰
- جدول ۱۶-درصد ساختارهای ثانویه محاسبه شده در تکنیک CD.....۸۴
- جدول ۱۷-تفاوت میزان جذب کلون های مشابه و متفاوت از باکتری در ساعات مختلف قبل از القا.....۸۹
- جدول ۱۸-ارتباط دمای محیط با زمان انکوباسیون.....۹۰

Abstract

Calprotectin is member of the S-100 protein family with a wide plethora of intra-and extracellular functions. Anticancer activities, antimicrobial effects and being a qualified disease marker are among the compelling features of this protein to be used as a pharmaceutical agent. However, there are several impediments to applications of protein pharmaceuticals including: proteolytic degradation, short circulating half-life, low solubility and immunogenicity. PEG is a common bioconjugation polymer capable of overcoming these drawbacks. Two hundred μ l of S100A8/9+Ca complex (1.9mg/l), was dissolved in 100ml of 0.1M sodium tetraborate at 3 different pH (6.5, 7.2 and 9.2). This solution and activated mPEG in different ratio concentration (0.01mM 0.025mM, 0.001mM) were mixed at 4°C and room temperature. After 1h uncoupled mPEG was removed by dialysis using PBS dialysis buffer (NaCl 25mM, NaH₂PO₄ 100mM, pH=7.2) for 18 h according to. Recombinant expression and purification of calprotectin along

with its PEGylation would result in enhanced pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. Our florescence spectroscopy and far UV-OD results indicate that PEGylation altered the physical and structural properties of the calprotectin to become in a more stable and functionally active state. Due to enhanced pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of the calprotectin via PEGylation, this study would pave the way for better in vitro and in vivo validations of calprotectin applications in medical practice.

Keywords: calprotectin, PEGylation, far UV-OD, florescence